

KLONING GEN Rv 1980c PENGKODE PROTEIN MPT 64 *Mycobacterium tuberculosis* SEBAGAI ANTIGEN UNTUK IMMUNODIAGNOSTIK TUBERKULOSIS LATEN

Irfandi¹, Rosana Agus², Muh. Nasrum Massi³, Fahrudin²

1. Mahasiswa Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, 90245
2. Dosen Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, 90245
3. Dosen Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, 90245

email : irfandibiologi@gmail.com

ABSTRAK

Mycobacterium Protein Tuberkulosis 64 (MPT 64) adalah protein spesifik yang dikodekan oleh gen Rv 1980c dengan ukuran gen 671 bp dan dihasilkan selama pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri penyebab penyakit Tuberkulosis yang mengakibatkan kematian dalam jumlah yang besar di dunia, sehingga dibutuhkan suatu metode untuk mendeteksi adanya bakteri ini dalam tubuh seseorang. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan klon rekombinan gen Rv 1980c pengkode protein MPT 64 yang akan menjadi dasar untuk imunodiagnostik TB laten. Metode yang digunakan adalah melakukan pemurnian produk PCR, meligasi vektor plasmid pGEM-T Easy dengan produk purifikasi dan mentransformasi pada sel kompeten *Escherichia coli* JM 109. Hasil penelitian menunjukkan gen Rv 1980c pengkode protein MPT 64 berhasil di klon ke dalam vektor pGEM-T Easy dengan persentase 69%. Hal ini ditandai dengan terbentuknya koloni putih. Koloni *Escherichia coli* yang berwarna putih menunjukkan DNA pengkode MPT 64 telah diligasi pada daerah *multi cloning site* (MCS) yang terdapat pada gen *lacZ* pGEM-T.

Kata Kunci : Antigen MPT 64, Kloning, pGEMT-Easy, Tuberkulosis

ABSTRACT

Mycobacterium Tuberculosis Protein 64 (MPT 64) is a specific protein encoded by the gene Rv 1980c with the size of 671 bp gene and produced during the growth of the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* is a disease-causing Tuberculosis bacteria that caused death in large amounts in the world, so we need a method to detect the presence of these bacteria in a person's body. This research purpose to produce the recombinant clones of protein- coding genes Rv 1980c MPT 64 that will be basic for immunodiagnosics latent TB. The method used is purified the PCR product, ligated the plasmid pGEM-T Easy vector with the purification product and transformed to *Escherichia coli* JM 109 competent cells. The research results that Rv 1980c genes protein-coding MPT 64 is successful to cloned inside the pGEM-T Easy vector with percentage of 69%. It's marked with the formation of white colonies. *Escherichia coli* colonies that white shows the DNA encoding of the MPT 64 had been ligated at multiple cloning site (MCS) area inside the *lacZ* pGEM-T.

Keywords: Antigen MPT 64, Cloning, pGEMT-Easy, Tuberculosis

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit ini biasanya mempengaruhi paru-paru (TB paru) tetapi dapat juga mempengaruhi daerah lain. Penyakit ini menyebar di udara ketika orang-orang yang menderita penyakit TB paru mengeluarkan bakteri TB, misalnya dengan batuk (WHO, 2015). *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri yang mempunyai kandungan lemak yang tinggi pada membran selnya sehingga menyebabkan bakteri ini menjadi tahan terhadap asam. Bakteri ini tidak tahan terhadap sinar ultraviolet, karena itu penularannya terjadi di malam hari (Tabrani, 2010).

Menurut estimasi WHO (*World Health Organization*) tahun 2014 Asia Tenggara dan daerah Pasifik Barat secara kolektif menyumbang 58% dari kasus TB di dunia. Wilayah Afrika memiliki 28% dari kasus di dunia yaitu 281 kasus kejadian per 100.000 populasi rata-rata. Indonesia menduduki peringkat kedua kasus TB terbanyak di dunia setelah India (WHO, 2015). Data dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2015) menunjukkan pada tahun 2014 ditemukan jumlah kasus baru BTA+ sebanyak 176.677 kasus, hal tersebut mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kasus baru BTA+ yang ditemukan tahun 2013 yang sebesar 196.310 kasus. Jumlah kasus tertinggi yang dilaporkan terdapat di Propinsi Jawa Barat yaitu sekitar 31.469 kasus.

Kasus tuberkulosis di Sulawesi ditemukan sekitar 22.597 kasus, dengan jumlah kasus tertinggi terdapat di Provinsi Sulawesi Selatan yaitu sekitar 8.297 kasus. Khusus di Kota Makassar, berdasarkan data yang diperoleh dari Bidang Bina Pencegahan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Dinas Kesehatan Kota Makassar, angka penemuan penderita baru TB Paru BTA+ tahun 2013 sebanyak 72,44 % (ditemukan 1.811 penderita dari

sebanyak 2.500 sasaran), jumlah ini meningkat dari tahun 2012 dengan jumlah penderita sebanyak 1.324 dari 1.641 sasaran (Dinas Kesehatan Makassar, 2014).

Menurut Martin dan Hasibuan (2010) infeksi TB terjadi karena inhalasi *droplet nuclei* yang mengandung kuman tuberkulosis. Setelah terpapar kuman TB ada empat keadaan yang bisa terjadi yaitu pertama tidak terjadi infeksi (ditandai dengan tes kulit tuberkulin yang negatif), kedua terjadi infeksi kemudian menjadi TB yang aktif (TB primer), ketiga menjadi TB laten dimana mekanisme imun mencegah progresivitas penyakit menjadi TB aktif dan keempat menjadi TB laten tetapi kemudian terjadi reaktivasi dan berkembang menjadi TB aktif dalam beberapa bulan sampai beberapa tahun kemudian. Infeksi TB laten didefinisikan sebagai kondisi seseorang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* tetapi saat ini orang tersebut tidak sakit, tidak mempunyai gejala/ *asymptomatic* dan gambaran foto toraks normal. Diperkirakan sekitar 5% - 10% dari orang dengan infeksi laten, akan terjadi reaktivasi dan menjadi TB aktif.

Indonesia yang merupakan salah satu negara berkembang, diagnostik tuberkulosis (TB) dilakukan secara mikroskopik pada sputum untuk melihat keberadaan dan jumlah basil tahan asam (BTA). Namun tantangan utama dalam pengendalian TB adalah bagaimana mendiagnosis secara cepat dan tepat infeksi TB khususnya TB laten. Sampai saat ini deteksi infeksi TB laten tidak memiliki standar baku, dan masih dilakukan dengan uji *tuberculin skin test* (TST) (Menzies, *et al.*, 2007).

Tes tuberkulin merupakan satu-satunya metode yang digunakan secara luas untuk mengetahui seseorang sudah terinfeksi tuberkulosis paru. Namun tes ini memiliki beberapa kelemahan yaitu uji tuberkulin hanya bisa menentukan bahwa seseorang pernah terinfeksi kuman TB,

tetapi tidak bisa menentukan apakah infeksi TB tersebut masih berlangsung atau sudah tidak aktif. Selain itu, uji ini juga tidak bisa membedakan apakah hasil positif terjadi karena infeksi TB atau karena imunisasi BCG. Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan lebih lanjut seperti foto rontgen, pemeriksaan mikroskopis dahak, atau biakan dahak (Kenyorini, *et al*, 2006). Terdapatnya kekurangan dari TST, maka disarankan untuk melakukan uji imunodiagnostik agar hasil yang diperoleh dapat dikonfirmasi kebenarannya.

Pencarian antigen *Mycobacterium tuberculosis* yang reaktif terhadap serum penderita tuberkulosis laten terus dilakukan untuk menangani penderita TB yang semakin meningkat. Pada penelitian Hasegawa, *et al*. (2002) diketahui bahwa *Mycobacterium Protein Tuberkulosis* (MPT 64) merupakan antigen spesifik untuk *Mycobacterium tuberculosis*. MPT 64 merupakan protein penting yang dihasilkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. MPT 64 yang dihasilkan dari *Mycobacterium tuberculosis* adalah bagian pertama yang berinteraksi dengan sistem kekebalan tubuh inang, sehingga protein tersebut penting untuk mengaktifkan respon imun pada individu yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Yi Jiang, 2013).

Kumar, *et al*. (2012) mengatakan bahwa antigen MPT 64 tidak ditemukan pada strain BCG, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* maupun pada NTM. Protein MPT 64 berada pada daerah RD2 dan menunjukkan antigen yang imunodominan pada studi imunoreaktivitas terhadap berbagai jenis hewan uji (Kalra *et al.*, 2010). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa MPT 64 merupakan salah satu antigen terbaik dari RD 2 yang menunjukkan reaksi hipersensitivitas yang kuat dan dapat memicu IFN- γ pada pasien TB dan kontak.

Berdasarkan latar belakang di atas, perlu dilakukan produksi antigen MPT 64 dengan teknologi DNA rekombinan.

Produksi antigen tersebut dapat dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan kloning gen penyandi protein MPT 64 untuk digunakan sebagai immunodiagnostik. Dihasilkannya protein tersebut akan dapat memberikan proteksi terhadap penderita TB laten pada usia produktif, yang pada akhirnya diharapkan dapat mengurangi angka morbiditas dan mortalitas yang disebabkan oleh TBC.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan adalah centrifuse (profuge), waterbath (memmert), vortex (heidolph), timbangan (kern ew), inkubator shaker (heidolph), inkubator 1000 (titramax 1000), inkubator (memmert), mesin elektroforesis (bio rad), geldoc (bio rad), mikropipet (bio rad), tabung 1,5 ml dan 0,5 ml (axygen), tabung 50 ml (iwaki), oven (electrolux), kulkas (LG), freezer (gea), ice maker (hoshizaki), autoklav (hirayama), laminar air flow (labconco), tabung reaksi (pyrex), cawan petridish, erlenmeyer (pyrex), tabung mikrosentrifuga, mikrotube (eppendorf), tabung eppendorf, rak tabung eppendorf, power supply (power pac 100 biorad), gelas ukur (pyrex), gelas kimia, mesin *heatshock*, botol reagen, spatula drygalski.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Produk PCR MPT 64, Agarose, buffer PB, buffer PE, buffer EB, enzim T4 DNA ligasi, 2x *rapid ligation buffer*, *nuclease free water*, plasmid pGEM-T Easy, strain *E.coli* JM 109, medium Luria Bertani (LB), CaCl₂, ampicillin, IPTG, X-Gal, aquades, tris base, asam borat, EDTA, buffer TBE, EtBr, Qiagen Kit, loading dye, marker 100 bp, NaCl, Bacto trypton, Bacto agar, Bacto yeast.

Prosedur Kerja

Pemurnian produk PCR dengan Kit Geneaid, Biotech, Ltd.

Pemurnian produk PCR menggunakan Kit Geneaid (Qiagen) yang mempunyai kolom EZ-10. Kit tersebut memiliki tahapan dalam purifikasi yaitu *gel dissociation*, *DNA binding*, *Wash* dan *DNA elution*. Pemurnian bertujuan agar mendapatkan fragmen DNA murni yang akan diligasikan ke vektor kloning.

Produk PCR hasil elektroforesis pada gel agarose diambil sebanyak 10 µL kemudian ditambahkan larutan buffer PB 50 µL dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Kemudian diinversi hingga produk PCR dan buffer PB homogen, selanjutnya dipindahkan ke tabung spin column dan disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama satu menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan sebanyak 700 µl buffer pencuci PE ditambahkan ke dalam spin colom, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang terbentuk dibuang, setelah itu colom dipindahkan ke eppendorf steril dan ditambahkan 35 µl buffer EB. Selanjutnya didiamkan selama 3 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit, cairan yang terbentuk dibuang sampai didapatkan DNA pekat. Produk yang sudah di purifikasi di cek dengan menggunakan elektroforesis gel agarose.

Elektroforesis hasil purifikasi produk PCR dilakukan dengan cara membuat gel Agarosa sebanyak 0,75 gr ke dalam 50 mL TBE, kemudian panaskan dalam *microwave* ±3 menit tanpa diaduk, kemudian angkat dan dinginkan lalu ditambahkan EtBr (*Ethidium Bromida*), kemudian cetak ke dalam cetakan agar yang telah diatur. Biarkan hingga memadat. Kemudian masukkan 7 µL sampel ke dalam masing-masing sumur gel yang ditambah dengan 2 µL loading dye. Selanjutnya mesin elektroforesis dijalankan dengan 100 volt selama ± 3 jam. Hasil elektroforesis kemudian dibaca

menggunakan geldoc.

Ligasi DNA *orf* MPT 64 ke vektor kloning pGEM-T Easy

Proses ligasi dilakukan dengan menggunakan T4 DNA Ligasi. Komposisi reaksi ligasi terdiri dari purif MPT 64 (sampel) 5 µL, pGEM-T Easy 1 µL, enzim T4 DNA ligase 1 µL, *2x rapid ligation buffer* 2 µL, dan *nuclease free water* 3 µL. Masing-masing komposisi dimasukkan dalam tabung 1,5 mL. Proses pencampuran dilakukan diatas es. Setelah semua larutan berada dalam kondisi homogen, maka akan dilakukan inkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam.

Transformasi Pada Sel Kompeten *E. coli* JM 109

A. Pembuatan Sel Kompeten

Sel kompeten yang digunakan ialah sel kompeten strain *E. coli* JM 109. Koloni tunggal *E.coli* JM 109 ditumbuhkan dalam 5 mL Medium LB (Luria Bertani). Kemudian dishaker pada 37°C selama 18 jam pada 150 rpm. Selanjutnya ke dalam 20 mL LB dimasukkan 2% kultur dan di inkubasi lagi 37°C selama 2 jam. Kultur didinginkan dalam es selama 10 menit.

Kultur sebanyak 1,5 mL dipindahkan ke tabung eppendorf. Kemudian disimpan di dalam es selama 10 menit. Sentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, kemudian ke dalam natan/endapan dimasukkan 300 µL CaCl₂, resuspensi pelan-pelan dan di sentrifugasi lagi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan tambahkan 50 µl CaCl₂ dingin kemudian diinkubasi semalam pada suhu 4°C.

B. Transformasi pada *E.coli* JM 109

Metode yang digunakan dalam transformasi ini adalah *heat shock* berdasarkan Sambrook *et al.*,(1989). Sebanyak 10 µL produk ligasi dimasukkan ke dalam 50 µL sel kompeten. Sebagai kontrol positif digunakan sel kompeten

Escherichia coli tanpa penambahan antibiotik dan sel kompeten *Escherichia coli* yang ditambahkan dengan antibiotik sebagai kontrol negatif. Ketiga tabung diinkubasi dalam es selama 1 jam.

Proses *heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 90 detik, kemudian diinkubasi dalam es selama 1 jam. Selanjutnya ditambahkan media LB cair sebanyak 600 µL. Tabung diinkubasi dengan menggunakan inkubator goyang pada suhu 37°C, selama 3 jam dengan 150 rpm. Selanjutnya disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Produk ligasi sejumlah 600 µL dipekatkan menjadi 150 µL kemudian disebarkan masing-masing 50 µL pada 15 mL media Luria- Bertani (LB) padat yang mengandung 0,15 mg/mL ampicilin, 0,8 mg X-gal dan 0,397 mM IPTG. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.

Analisis Data

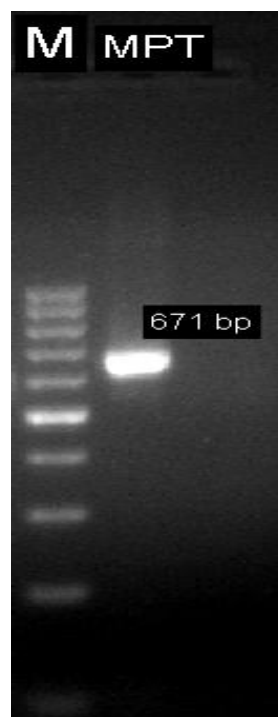
Hasil kloning Rv 1980c pengkode protein MPT 64 dianalisis berdasarkan ada

tidaknya koloni putih biru yang terbentuk, kemudian data disajikan dalam bentuk gambar dan dijelaskan secara deskriptif. Koloni yang mengandung pGEM-T Easy dengan DNA sisipan gen MPT 64 akan berwarna putih. Sedangkan koloni biru merupakan *E.coli* yang hanya membawa plasmid pGEM-T Easy tanpa gen MPT-64.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Purifikasi DNA Produk dengan menggunakan Purification Kit (Qiagen)

Hasil amplifikasi gen MPT 64 dicek dengan menggunakan gel agarose. Setelah mengetahui pita yang ada pada hasil amplifikasi sudah terbentuk dengan densitas tinggi, hasil amplifikasi DNA selanjutnya dipurifikasi. Pada penelitian ini digunakan *purification kit* (Qiagen) untuk purifikasi produk PCR. Hasil purifikasi produk PCR kemudian dielektroforesis dan dilakukan pengecekan pita DNA pada gel agarosa. Selanjutnya divisualisasikan dengan menggunakan mesin geldoc sehingga dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 1. Pita DNA Hasil Purifikasi Ket. : M= Marker 100 bp, MPT= Mycobacterium Protein Tuberkulosis 671 bp

Pada gambar 7 dapat dilihat adanya satu band DNA yang terbentuk dan berpendar sebagai hasil purifikasi. Band DNA yang berpendar ini merupakan hasil reaksi antara DNA dan ethium bromide (EtBr). EtBr adalah senyawa yang dapat mengikat DNA sehingga apabila disinari dengan sinar UV akan terlihat band yang berpendar (berwarna terang).

Marker digunakan sebagai penanda untuk mengetahui ukuran band DNA yang terbentuk. Marker yang digunakan pada penelitian ini adalah marker 100 bp. Pada gambar 7 dapat dilihat adanya pergerakan atau migrasi pada sampel hasil purifikasi. Band DNA yang terbentuk dan berpendar berada diantara band ke-6 dan ke-7 pada marker, hal ini menandakan bahwa ukuran band DNA yang terbentuk berada antara 600 bp – 700 bp. Setelah itu dilakukan pengecekan pada data gen Bank sehingga didapatkan ukuran gen MPT 64 yaitu sebesar 671 bp. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Fu, *et al*, (2009) bahwa gen MPT 64 memiliki ukuran 671 bp. Terbentuknya band DNA yang berukuran 671 bp dan tidak terdapat dimer pada visualisasi hasil elektroforesis membuktikan bahwa purifikasi yang dilakukan telah berhasil. DNA *insert* (MPT 64) hasil purifikasi telah siap digunakan pada tahapan selanjutnya untuk diligasikan ke vektor pGEM-T Easy.

Ligasi Vektor Plasmid pGEM-T Easy dengan produk purifikasi

Hasil purifikasi produk PCR yang telah diperoleh selanjutnya dijadikan sebagai *insert* dalam proses ligasi ke vektor kloning. Pada penelitian ini digunakan vektor kloning pGEM-T Easy karena memiliki daerah *Origin of Replication* (ORI), memiliki situs gen resisten ampisilin (Amp^r) dan gen *lacZ* yang berperan dalam skринing biru-putih pada saat transformasi ke sel kompeten *Escherichia coli* JM 109. Menurut Kendrew and Lawrence (1994) vektor

pGEM-T Easy merupakan plasmid linear yang memiliki basa Timin (T) menggantung (*overhangs*) pada kedua ujungnya. Daerah T-*overhangs* pada situs pemasukan *insert* dapat meningkatkan efisiensi ligasi untuk produk PCR karena mencegah terjadinya resirkularisasi.

Pada penelitian ini digunakan perbandingan insert dan vektor 5:1. Penambahan insert dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan vektor dimaksudkan untuk memperbesar peluang insert dalam berikatan dengan vektor yang digunakan. Suhu optimum untuk aktivitas DNA ligase yaitu berada pada suhu 30°C. Namun, pada suhu ini ikatan hidrogen yang terbentuk antara insert dan vektor menjadi tidak stabil dan mengakibatkan terjadinya kerusakan karena suhu tinggi. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan suhu 4°C dan diinkubasi selama satu malam. Hasil dari ligasi tidak dapat dilihat secara kasat mata, sehingga perlu dilakukan transformasi ke dalam sel kompeten *E.coli* JM 109 dan ditumbuhkan pada media LB yang ditambahkan ampicillin, IPTG dan X-gal.

Transformasi Sel Kompeten *E. coli* JM 109

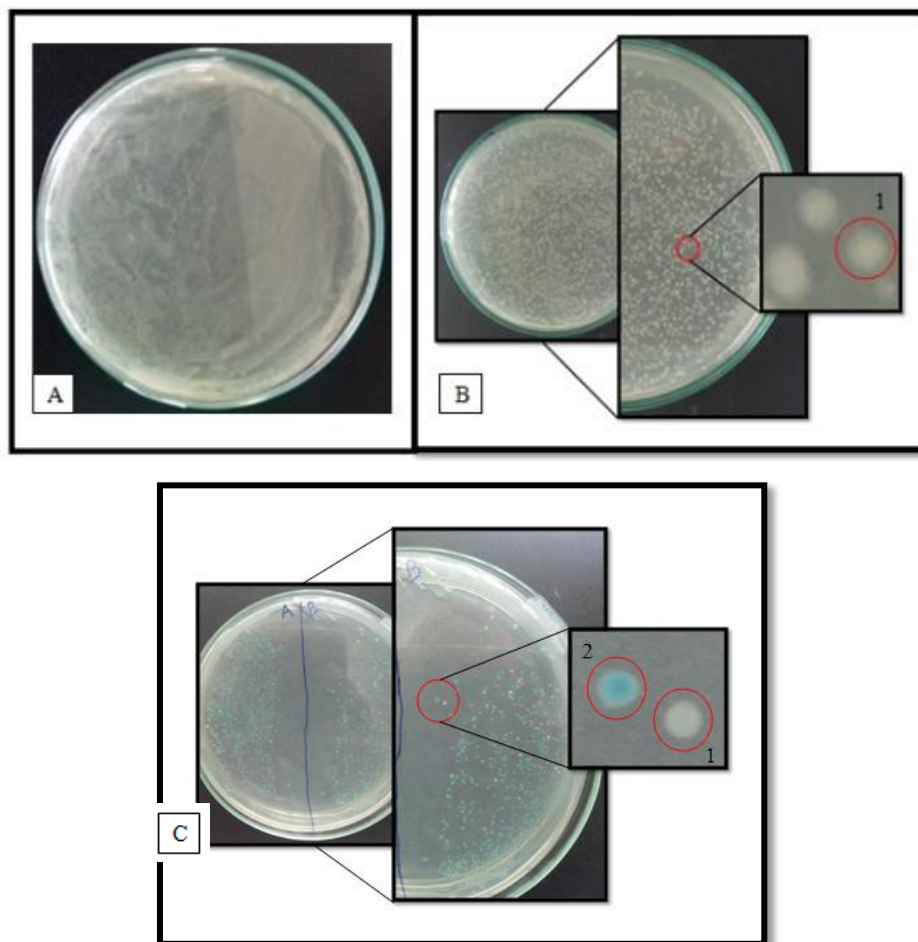
Transformasi dilakukan menggunakan sel kompeten *Escherichia coli* JM 109 yang berfungsi sebagai organisme yang akan memperbanyak DNA insert. Sel *E. coli* dibuat kompeten supaya permeabilitas dinding selnya meningkat sehingga vektor rekombinan lebih mudah masuk ke dalam sel. Menurut Radji (2011) penambahan $CaCl_2$ dingin dapat menjadikan sel *E. coli* menjadi sel kompeten. Larutan $CaCl_2$ dalam keadaan dingin efektif menyebabkan perubahan permeabilitas dinding sel bakteri.

Metode transformasi yang digunakan yaitu metode *heat shock*. Metode *heat shock* merupakan metode sederhana yang dapat menyebabkan pori

-pori dari membran sel *E. coli* terbuka dalam waktu yang singkat dan siap untuk menerima vektor rekombinan yang akan masuk. Pada metode ini sel *E. coli* JM 109 diberi kejutan dengan suhu dingin dan suhu panas secara bergantian agar dinding selnya mengembang dan mengempis secara cepat sehingga memungkinkan DNA dari luar masuk ke dalam sel. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sambrook dan Russell (2001) yang menyatakan bahwa proses transformasi yang dilakukan dengan metode *heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 90 detik.

Pada umumnya bakteri tidak dapat hidup pada media yang mengandung antibiotik. Untuk itu pada DNA plasmid yang di transformasikan harus memiliki

gen penyandi resisten antibiotik sehingga bakteri yang menjadi hostnya dapat bertahan hidup pada media yang mengandung antibiotik. Bakteri yang tidak berhasil disisipi oleh plasmid akan mati dengan sendirinya. Pada penelitian ini digunakan antibiotik berupa ampicillin. Ampicillin merupakan antibiotik yang memiliki spektrum luas, aktif terhadap bakteri gram negatif maupun positif dengan cara menghambat secara *irreversible* aktivitas enzim transpeptidase yang dibutuhkan untuk sintesis dinding sel bakteri. Dengan adanya antibiotik ini akan menyeleksi pertumbuhan dari bakteri, sehingga hanya bakteri yang memiliki plasmid dengan daerah resisten ampicillin yang dapat tumbuh.



Gambar 2. Hasil transformasi dan skrining biru putih.

Keterangan : A = Kontrol Negatif, B = Kontrol Positif, C = Hasil Transformasi Sel kompeten *E. coli* JM 109, 1 = Koloni Putih, 2 = Koloni Biru

Tabel 1. Hasil Transformasi ke dalam *E.coli* JM 109

Sampel	Jumlah Koloni Putih	Jumlah Koloni Biru	Persentase	
			Koloni putih	Koloni Biru
A	1352	-	100 %	-
B	-	-	-	-
C	842	378	69 %	31 %

Tabel 1 menunjukkan bahwa proses ligasi dan transformasi sel *E.coli* JM 109 telah berhasil. Perbandingan jumlah koloni putih (sel rekombinan) : koloni biru (sel non rekombinan) adalah 2 : 1, hal ini menunjukkan proses transformasi berlangsung dengan baik (Jones, 1998).

Transformasi merupakan kelanjutan dari proses ligasi. Sebelum melakukan proses transformasi, dibuat suatu kontrol untuk mengetahui keberhasilannya (Brown, 2006). Pada penelitian ini digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif dibuat tanpa menambahkan antibiotik, sehingga dapat diketahui kemampuan sel kompeten untuk hidup di media tanpa antibiotik atau agen seleksi. Kontrol negatif dibuat dengan menambahkan antibiotik sehingga dapat menyeleksi sel bakteri yang tumbuh pada media tersebut hanya sel yang kompeten.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa sampel A (kontrol negatif) yaitu *E. coli* JM 109 hasilnya sama sekali tidak tumbuh koloni pada media LB ampicillin, hal ini dikarenakan pada kontrol negatif hanya terdapat *E. coli* JM 109 yang tidak memiliki plasmid yang resisten terhadap ampicillin. Pada sampel B (kontrol positif) adalah plasmid pGEM-T Easy non-insert yang diklon kedalam *E.coli* JM 109, hasilnya tumbuh 1352 koloni berwarna putih dalam media LB ampicillin, hal ini dikarenakan pada kontrol positif terdapat plasmid pGEM-T Easy yang memiliki penanda resisten ampicillin. Sedangkan pada hasil transformasi sel kompeten yang ditunjukkan sampel C bakteri *E. coli* JM 109 yang ditambahkan oleh X-gal dan IPTG diperoleh 842 koloni bakteri berwarna putih dan 378 koloni biru.

Koloni putih yang terbentuk menandakan keberhasilan dari proses kloning yaitu plasmid berhasil disisipi dengan insert. Sedangkan koloni biru merupakan koloni bakteri yang tidak berhasil disisipi gen insert.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Izzah (2011) bahwa koloni *E. coli* yang berwarna putih (sel transforman) menunjukkan DNA pengkode MPT 64 telah diligasi pada daerah MCS (*multi cloning site*) yang terdapat pada gen *lacZ* dari plasmid pGEM-T Easy. Sisipan fragmen DNA ini akan menghambat gen *lacZ* untuk mengkode subunit β -galactosidase, sehingga enzim tersebut tidak dapat mendegradasi substrat galaktosa yang tersedia. Koloni bakteri berwarna biru, tidak memiliki fragmen DNA sisipan sehingga dapat mendegradasi substrat galaktosa yang tersedia.

Medium LB padat yang sudah ditambahkan antibiotik ampicillin, *isopropyl* β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), dan X-Gal, dapat digunakan sebagai medium seleksi pertumbuhan sel kompeten yang ditransformasi. Penambahan IPTG dimaksudkan sebagai induser transkripsi pada gen *operon lac* yaitu *lacZ*.

Gen *lacZ* akan mengkode suatu enzim β -galaktosidase yang berfungsi memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Adanya enzim β -galaktosidase dapat dideteksi dengan terjadinya pemecahan substrat X-gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside*) yang tidak berwarna menjadi galaktosa dan *5-bromo-4-chloroindigo* yang berwarna biru. Adanya enzim β -galaktosidase yang aktif akan menghasilkan koloni sel bakteri yang berwarna biru. Hal ini menunjukkan

tidak adanya DNA sisipan di dalam plasmid vektor. Sebaliknya, sel yang tidak memiliki aktivitas enzim β -galaktosidase akan menghasilkan koloni sel bakteri yang berwarna putih. Hal ini disebabkan adanya sisipan fragmen DNA yang terletak diantara gen *lacZ* sehingga fragmen DNA akan menginaktifkan ekspresi dari gen *lacZ* (Madigan and Martinko, 2005).

Tes tuberkulin merupakan satu-satunya metode yang dapat digunakan secara luas untuk mengetahui seseorang sudah terinfeksi tuberkulosis paru (Palomino, 2005). Namun tes ini memiliki beberapa kelemahan yaitu kurang spesifik, tidak bisa membedakan antara infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan *Myobacterium bovis* strain Bacillus Calmette- Guerin, tidak bisa membedakan antara seseorang pasien tuberkulosis paru atau laten dan membutuhkan kecakapan individu dalam menginterpretasikannya.

Hasil transformasi yang didapatkan menunjukkan keberhasilan proses transformasi vektor ke dalam sel host *E.coli JM 109*. Proses transformasi ini penting dilakukan untuk mengetahui bahwa bakteri yang telah ditumbuhkan pada media ampicillin berhasil disisipi dengan gen MPT 64 atau tidak. Koloni putih yang terbentuk merupakan bakteri yang berhasil disisipkan gen MPT 64. Koloni putih ini dapat digunakan sebagai kandidat antigen untuk immunodiagnostik tuberkulosis laten. Immunodiagnostik memiliki peluang sebagai metode yang lebih spesifik dalam mengenali infeksi TB tersebut, dengan menggunakan antigen yang dimurnikan untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap kuman TB di tubuh pasien. Klon rekombinan Rv1980c-pGEMT Easy yang terbentuk dapat digunakan sebagai antigen untuk diagnosis tuberkulosis laten dengan melihat reaksi antigen dan antibodi.

KESIMPULAN

Gen Rv 1980c pengkode protein MPT 64 telah berhasil di klon ke dalam

vektor kloning pGEM-T Easy dengan persentase 69%. Hal ini ditandai dengan terbentuknya koloni putih

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T. 2006. **Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction, 5th edition**. Blackwell Publishing Asia Pty Ltd. Australia.
- Dinas Kesehatan Makassar. 2014. **Profil Kesehatan Kota Makassar 2013**. Pemerintah Kota Makassar. Makassar.
- Fu, R., Chun, W., Chunwei, S., Mengji, L., Zhengming, F., Jia, L., Fang, W., and Xionglin, F. 2009. **An Improved Whole-Blood Gamma Interferon Assay Based on the CFP21-MPT64 Fusion Protein**. Journals Clinical And Vaccine Immunology. Vol. 16 [5], p. 686-691.
- Hasegawa, N., Takao, M., Koudou, I., Kazuhiro, Y., Thomas, H. L., Samuel, M., Janis, D. M., Salman, H. S. 2002. **New Simple and Rapid Test for Culture Confirmation of Mycobacterium Complex: a Multicenter Study**. Journal Of Clinical Microbiology. Vol.40 (3), pp 908-912.
- Izzah, A., dan Agus, K. B., 2012. **Analisis Tanaman Jarak Pagar Transgenik (*Jatropha curcas* L.) Menggunakan Primer Gen GusA**. Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Muhammadiyah. Malang.
- Jones, P. 1998. **Vectors Cloning Applications-essential Techniques**, John Wiley & Sons. BIOS Scient Publishers. NewYork.

- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015. **Data dan Informasi Tahun 2014 (Profil Kesehatan Indonesia)**. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Kendrew, S. J., Lawrence, E. 1994. **The Encyclopedia of Molecular Biology**. Blackwell Science. Cambridge.
- Kumar, V. G., Urs, T. A., Ranganath, R. R. 2011. **MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates**. BMC research note.
- Madigan, M.T. and Martinko J.M., 2005. **Brock Biology of Microorganisms 11th ed**. Prentice Hall. New Jersey.
- Martin, U. dan P. Hasibuan. 2010. **Prevalens TB Laten Pada Petugas Kesehatan di RSUP H. Adam Malik Medan**. J Respir Indo. Vol. 30 (2).
- Palomino J. C. 2005. **Nonconventional and New Methods in Diagnosis of Tuberculosis**. Feasibility and Applicability in the Field. Jurnal Eur Respir. Vol. 26: 339- 50.
- Promega. 2010. **pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems**. Woods Hollow Road Madison. USA.
- Radji, M. 2011. **Rekayasa genetika Pengantar Untuk Profesi Kesehatan**. Penerbit Sagung Seto. Jakarta.
- Sambrook, J., dan D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Volume 1-3. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Tabrani, R. 2010. **Ilmu Penyakit Paru**. Trans Info Media. Jakarta.
- WHO. 2015. **Global Tuberculosis Report**. World Health Organization.
- Yi Jiang, Hairan, L., Haiyin, W., Xiangfeng, D., Xiugin, Z., Yun, B., Li, W., Guilian, L., Wen, Z., Chen, C., Kanglin, W. 2013. **Polymorphism of Antigen MPT 64 in *Mycobacterium tuberculosis* Strains**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 51 (5): 1558 – 1562.